

## **A PÁLYÁZAT EREDMÉNYEINEK BEMUTATÁSA.**

### **A vírus gazda kapcsolatban fontos szerepet játszó az RNS silencing generálta kis RNS-ek meghatározása, jellemzése**

Az RNS silencing egy géninaktivációs mechanizmus, amely szinte az összes eukarióta szervezetben működik, és magába foglalja az állati RNS interferencia és a növényi poszt-transzkripcionális gécscsendesítés jelenségét. A jelen pályázat célja a vírus indukálta RNS silencing szerepének molekuláris szintű megismerése a vírus-növény kapcsolatban.

Első lépésként a vírusgenomról származó kis RNS feltérképezését végeztük el. Ebből a célból a nagy hatékonyságú 454 (Life Science), illetve a Solexa (Illumina) technológiákat alkalmaztuk, amelyek egyetlen futtatással több százezer (454), illetve több millió (Solexa) kis RNS szekvenciáját képes meghatározni. Kísérleti rendszerünkben a *Cymbidium ringspot* vírust (CymRSV) és silencing szuppressor mutánsát (Cym19stop) használtuk. Mindkét vírussal *Nicotiana benthamiana* növényeket fertőztünk. A fertőzött növényekből izoláltuk 21-26nt RNS-eket, majd az izolált RNS-ek szekvenciáit kétféle nagy áteresztőképességű módszerrel (454 illetve Solexa szekvenálás) határoztuk meg. A szekvenciáknak a vírus genomra való *in silico* térképezésével kapott kis RNS profilok összehasonlításával megállapítottuk, hogy a vírus RNS pozitív száláról nagyobb mennyiségben képződnek kis RNS-ek, és a genom különböző régióiról származó kis RNS-ek mennyisége is jelentősen eltér egymástól, ebből a szempontból ún. forró pontok azonosíthatók. Bár mindkét módszerrel (454 és Solexa) kapott szekvenciák elemzése ezt mutatta, a profilok eltértek egymástól, és a kísérleti (hibridizációs) eredményekkel való összevetés során a Solexa módszerrel kapott kis RNS profil bizonyult megbízhatóbbnak. Nem volt azonban számottevő különbség a vad típusú illetve a szuppressor-mutáns vírussal fertőzött növények között a vírus-eredetű kis RNS-profilban.

Valószínűsítettük, hogy a pozitív szálú RNS erős másodlagos szerkezete felelős a pozitív szálú kis RNS-ek túlsúlyáért. Predikciós algoritmusokkal azonban nem tudtunk egyértelműen felelőssé tehető szerkezeti elemeket azonosítani. Ennek egyik lehetséges oka, hogy egymástól távol eső régiók komplementaritása játszik szerepet a struktúrák kialakulásában. A kísérleti úton (Solexa) meghatározott kis RNS

szekvenciákból potenciálisan kialakulni képes duplexeket prediktálva igazolódott, hogy a pozitív számról jóval több ilyen duplex-képzésre hajlamos kis RNS származik, mint a negatívról, és a duplex-képző párok tagjai gyakran a genomon egymástól távol helyezkednek el.

A kis RNS-ek hosszúság-eloszlásának elemzése megmutatta, hogy a vírus szuppresszor mutációja a 22 nukleotid hosszúságú termékek mintegy kétszeres túlsúlyát eredményezi a 21 nukleotid hosszúságúakkal szemben, mely utóbbiak a vad típusú vírussal fertőzött növényben nagyobb számban jelennek meg, mint a 22 nukleotid hosszúak. Ez arra utal, hogy a kis RNS-ek képződéséért feltehető a Dicer Like (DCL) 4 illetve DCL2 növényi dicer komplexek a felelősek.

A növényi genom és vírus kisRNS szekvenciák összehasonlításával olyan mRNS szekvenciákat valószínűsítettünk a Solanaceae családba tartozó növényfajokban, amelyek a CymRSV kis RNS-ek potenciális célpontjai lehetnek. Jelenleg ezeknek a potenciális targeteknek a kísérletes azonosítása folyamatban van.

A pályázat idevágó eredményeit az alábbi közleményekben írtuk le:

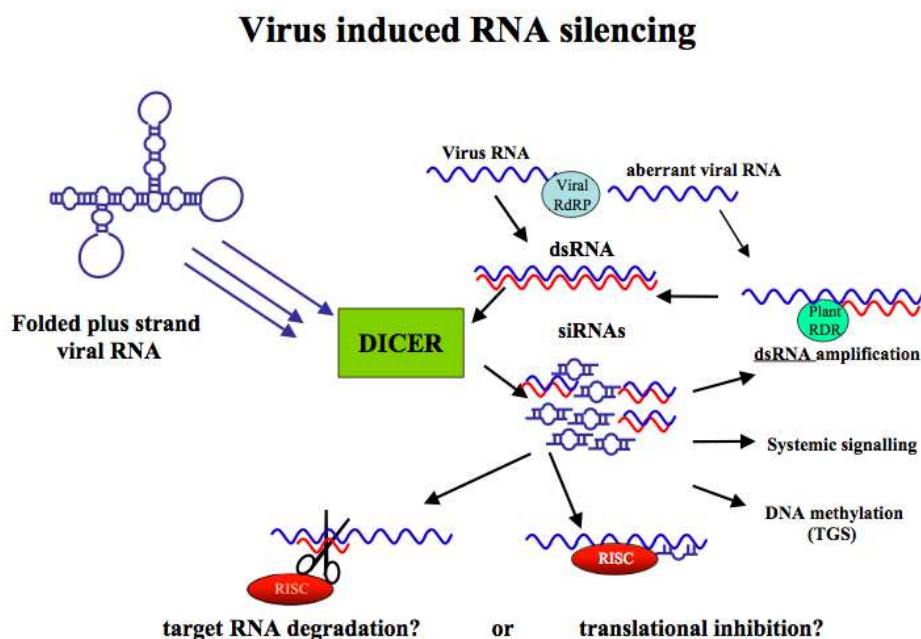
Szittyá, Gy., Tóth, G., Rusholme, R., Dalmay, T., Burgyán, J. (2009). Structural and Functional Analysis of Viral siRNAs. PLOS Pathogen, Submitted

Csorba, T., Lozsa, R., Lakatos, L., Burgyán, J. (2008). Molecular mechanisms and side-effects of viral RNA silencing suppressors (state of the art talk). XIV. International Congress of Virology, 2008. August 10-15, Istanbul, Törökország

Szittyá, Gy., Rusholme, R., Tóth, G., Barta, E., Dalmay, T., Burgyán, J. (2007) Vírus eredetű kis RNS-ek elemzése dohányban 454 „deep sequencing” technológiával. VII. Magyar Genetikai Kongresszus, 2007. április 15-17, Balatonfüred; 40-41 o.

Tóth, G., Barta, E., Szittyá, Gy., Rusholme, R., Dalmay, T., Burgyán, J. (2007) Small RNA profiles of virus-infected *Nicotiana benthamiana* plants. 15<sup>th</sup> Annual International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology (ISMB) and 6<sup>th</sup> European Conference on Computational Biology (ECCB), 2007. július 21-25, Bécs, Ausztria.

## Az RNS silencing-en alapuló antivirális válasz molekuláris mechanizmusának feltárása

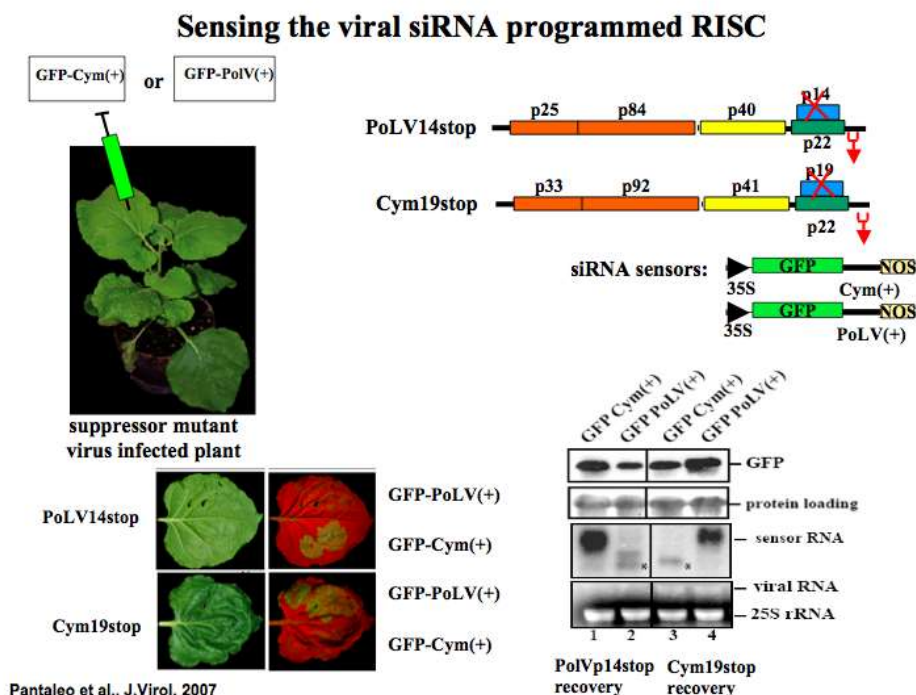


### 1. Ábra. Az vírus indukálta RNS silencing egyszerűsített modellje.

A vírus indukálta RNS silencinget duplaszálú RNS-ek, illetve egy szálú RNS-en megtalálható lokális kétszálú (ds) strukturái indukálják, amelyeket Dicer komplex processzál 21-24 nt hosszú siRNS-ekké. Ds vírus RNS-ek a vírus replikáció (virális RNS függő RNS polimeráz, RdRp) köztes termékei, illetve a növényi RNS függő RNS polimeráz (plant RdRp) produktumai. A keletkezett vírus siRNS-ek beépülnek a növényi RISC komplexbe aktiválva azt. A siRNS aktiválta RISC komplex a siRNS szekvencia alapján találja meg a vírus genomot amelyet inaktívál target hasítással vagy transzlációs gátlással.

Az RNS silencingen alapuló antivirális válasz jelenlegi modellje szerint (1. Ábra) a vírus siRNS-el programozott RISC komplex gátolja a vírus genom expresszióját, oly módon, hogy gátolja annak transzlációját, vagy hasítja azt. Vizsgálataink megkezdésekor azonban nem volt ismert, hogy a két hipotetikus lehetőség közül melyik a jellemző. Ehhez a feladathoz vírus-specifikus szenzor konstrukciókat készítettünk oly módon, hogy GFP-t kódoló ORF-hez a vírus különböző részeit reprezentáló szekvenciát kapcsoltunk. Ezeket a konstrukciókat agroinfiltrációs módszerrel juttattuk be és fejeztük ki a Cym19stop mutáns vírussal fertőzött növény

kigyógyulást mutató (recovered) leveleibe. Mértük a szenzor konstrukciókról íródott mRNS-t és az expresszált GFP fehérjét Northern és Western analízissel. Megállapítottuk, hogy vírus siRNS-ekkel töltött RISC komplexek szekvenciaspecifikusan hasítják a szenzor konstrukciókat, tehát csökkent génexpresszió a szenzor molekulák RISC hasításának következményeként.



2. Ábra. Vírus siRNS programozott RISC komplexek aktivitásának érzékelése szenzor molekulákkal. A növényeket két silencing szupresszor mutáns vírussal (Cym19stop illetve PoLV14 stop) fertőztük. A növények az elsődleges tünetek megjelenése után kigyógyultak a vírusfertőzés okozta tünetekből, jelezve az RNS silencing aktiválását a kigyógyult vagy gyenge tüneteket mutató levelekben. Ezekben a levelekben expresszáltattuk a szenzor RNS-eket agrobaktériumos infiltrációval. A homolog targetszekvenciát (homolog vírus szekvenciát) hordozó szenzorokat hatékonyan hasították a vírus siRNS aktiválta RISC komplexek, akadályozva a GFP expressziót, amelyet jól követhetünk GFP fluoreszcencia, GFP fehérje felhalmozódás és szenzor mRNS hasításának követésével. A hasított mRNS-ek jól láthatóak a homolog (vírus-szenzor) kombináció esetében (2 és 3 csatornában csillaggal jelölt RNS sávok).

Továbbá megállapítottuk, hogy szenzor konstrukciókba integrált 190 nt hosszú vírus szekvenciák nem minden régióban vágódtak el. RISC vágásokat kizárólag egy 40 nt hosszú szakaszon azonosítottunk. Ezt úgy tudtuk meghatározni, hogy sikerült klónozni a vágásterméket, majd a szekvencia meghatározással azonosítottuk a vágási pontokat. Azt is igazoltuk, hogy a vágási forró pontok kialakulásáért feltehetően a

target RNS másodlagos szerkezete a felelős. Ismert ugyanis, hogy a RISC mediálta hasítást a target RNS erős másodlagos szerkezete nagyban gátolhatja. A target vírus RNS hasítását a természetes vírus fertőzés esetében is meghatároztuk, az elhasított vírus genom klónozásával és szekvenálásával. A szenzor RNS-ek hasítási helyei megegyeztek a természetes vírushatásban azonosított hasítási helyekkel, igazolva a szenzor RNS-ekkel végzett vizsgálatainkat. Az eredményeket összegezve megállapítottuk, hogy a vírus indukálta RNS silencing a vírus RNS hasításával gátolja a vírus genom expresszióját.

Vizsgálataink során egy nem várt, több szempontból fontos megfigyelést is tettünk. Ismert, hogy természetes vírushatásban esetén megfigyelhető egy gazda vírushoz (CymRSV)-hoz társult úgynevezett satellit RNS, amely a gazdavírus segítségével replikálódik mintegy parazitálva azt, és jelenlétével gyengíti a CymRSV fertőzés egyébként súlyos, sokszor letális tüneteit. Részletes vizsgálatok ellenére nem volt ismert az a mechanizmus, amely kontrollálja a gazda vírus és parazita (satellit RNS) felhalmozódását. Kísérletünk során feltártuk, hogy a gazdavírus (CymRSV) a vírus indukálta silencing segítségével kontrollálja parazita satellit RNS-ek felszaporodását. Azonosítottuk azt a gazdavírusról származó siRNS-t, amely a RISC komplexbe beépülve hasítja a satellit RNS-t, meggátolva annak túlzott felszaporodását. Meghatároztuk a satellit RNS-en a hasítás pontját is, amely mutációjával gátoltuk a hasítást és fokoztuk a parazita molekula felhalmozódását.

Ez a felismerés jelezte a vírus különleges adaptációs képességét, vagyis, hogy a CymRSV, a parazita satellit RNS és a növény ko-evolúciója során az antivirális RNS silencing kihasználásával kialakult egy olyan egyensúly a vírushatározott növényben, amely mind három résztvevő számára biztosítja a túlélés és ez által a fennmaradást.

A pályázat idevágó eredményeit az alábbi közleményekben írtuk le:

Burgyán J (2006) Virus Induced RNA silencing and suppression: Defence and Counter defence. **Journal of Plant Pathology** 88, 233-244.

Pantaleo V., Szittyá Gy. and Burgyán J. (2007) Molecular Bases of Viral RNA Targeting by Viral Small Interfering RNA-Programmed RISC. **J Virol.** 81(8):3797-806.

Pantaleo, V., and Burgyán, J. 2008. Cymbidium ringspot virus harnesses RNA silencing to control the accumulation of virus parasite satellite RNA. **J Virol** 82: 11851-11858

### **Silencing szupresszor fehérjék jellemzése**

A pályázat során részletesen vizsgáltuk a három legismertebb RNS silencing szupresszor fehérjék (tombusvírusok kódolta p19, potyvírusok kódolta HC-Pro és closterovírus kódolta p21) aktivitásának molekuláris mechanizmusát. Ezekhez a vizsgálatokhoz a laboratóriumunkban korábban kidolgozott *Drosophila* embrió és növényi *in vivo* rendszereket alkalmaztunk. Megállapítottuk, hogy mindhárom szupresszor fehérje a siRNS kötésével és kitérítésével megelőzi a RISC komplex kialakulását és gátolja az RNS silencing alapú antivirális védekezési mechanizmust. Továbbá *in vivo* és *in vitro* kísérletekkel azt is bizonyítottuk, hogy mind a három (p19, HC-Pro és p21) silencing szupresszor fehérje hatástalan, ha RISC komplex már összeépült a siRNS-el és egyszálú siRNS molekulát tartalmaz. Kísérleteinkbe bevontuk az *Arabidopsis thaliana* modell növényt is fertőző dohánymozaik vírus (cr-TMV) silencing szupresszor fehérjéjének azonosítását és jellemzését is, mivel így felhasználhattuk a rendelkezésre álló, silencing útvonalban mutáns növényeket is. Meghatároztuk, hogy a vírus genom első ORF-je kódolta a 122 kDa (p122) méretű fehérje hatékonyan gátolja az RNS silencing útvonalakat. *In vitro* siRNS kötési kísérletekkel és *in planta* vizsgálatokkal megállapítottuk, hogy a p122 fehérje méretspecifikusan köti a kétszálú siRNS és miRNS intermedier duplexeket, amelyeket 19 nukleotid (nt) hosszú duplex struktúra és 2 nt hosszú 3' túlnyúló szerkezet jellemez. A p122 szupresszor siRNS és miRNS intermedier duplexek kötésén keresztül meggátolja a RISC effektor komplex kialakulását, és ez által az antivirális silencing alapú növényi választ, illetve gátolja az egyes gének a miRNS-ken keresztül megvalósuló szabályozását. Továbbá azt is kimutattuk, hogy a siRNS és miRNS kötésével nem csak a RISC komplexbe való beépülést gátolja a p122 silencing szupresszor fehérje, hanem ezeknek a kis szabályzó RNS-eknek a 3' metilációját is. A nem metilált kis RNS-ek gyorsan lebomlanak, így nem tudnak beépülni a RISC komplexbe és aktiválni azt. Vizsgálatainkkal azt is igazoltuk, hogy miRNS metilációja nemcsak sejtmagban megy végbe (mint az korábban vélték), hanem a citoplazmában is. Megállapítottuk, a siRNS kötésen alapuló RNS silencing gátlás a növényi vírusokra általánosan jellemző.

Eredményeinket az alábbi közleményekben írtuk le:

Lakatos L., Csorba T., Pantaleo V., Chapman EJ., Carrington JC., Liu YP., Dolja VV., Fernández Calvino L., López-Moya JJ., Burgyán J. (2006). Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors. **EMBO J.** 25, 2768-80.

Hemmes H, Lakatos L, Goldbach R, Burgyán J, Prins M (2007). The NS3 protein of Rice hoja blanca tenuivirus suppresses RNA silencing in plant and insect hosts by efficiently binding both siRNAs and miRNAs. **RNA** 13, 1079-89

Csorba T., Bovi A, Dalmay T. and Burgyán J. (2007). The p122 subunit of Tobacco mosaic virus replicase is a potent silencing suppressor and compromises both siRNA and miRNA mediated pathways.. **J Virol.** 81(21):11768-80.

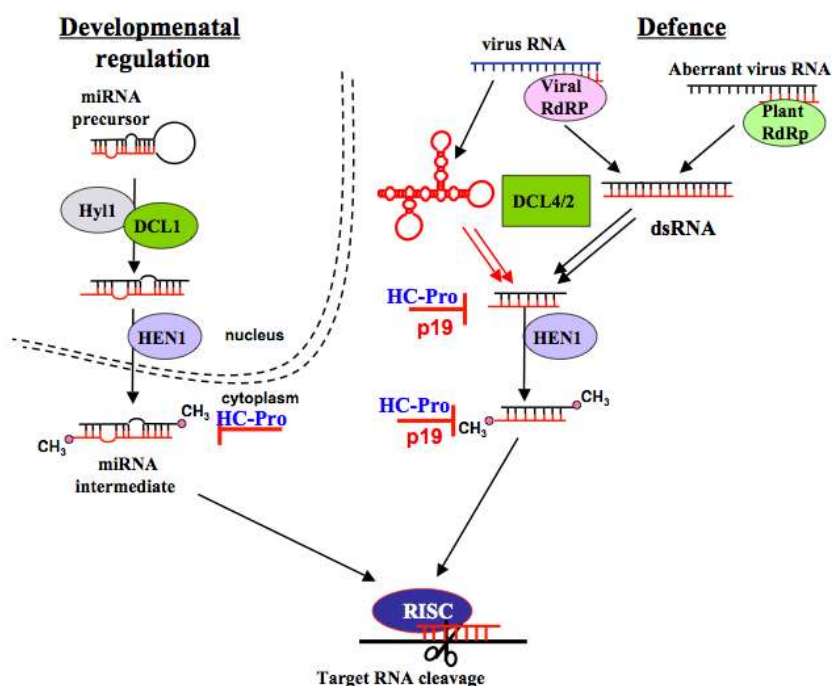
### **Vírus kódolta silencing szupresszor fehérjék hatása a miRNS-ek és siRNS-ek által kontrollált endogén RNS silencing útvonalakra**

Ismert, hogy a silencing szupresszor fehérjék egy jelentős csoportja a siRNS-ek és miRNS ds intermediér formáját kötve feltétlenül gátolja/gátolhatja az RNS silencing kialakulását. Ez az interakció a szupresszor fehérje és az endogén silencing útvonalak között megzavarhatja a gazdanövény normális fejlődését és a vírus fertőzés okozta tünetek magyarázataul is szolgálhat, amelyek molekuláris háttere az esetek túlnyomó többségében nem ismert. Vizsgálatainkba, két általunk korábban jól jellemzett silencing szupresszor fehérjét vontunk be, nevezetesen a *Tobacco etch virus* HC-Pro fehérjét és Carnation Italian ringspot p19 fehérjét. Mindkét szupresszor fehérje a ds siRNS kötésén keresztül gátolja az RNS silencinget. Nem volt ismert azonban, hogy ezek silencing szupresszor fehérjék, hogyan hatnak az endogén miRNS útvonalra természetes vírushatás esetén.

A két vírus kompartmentalizációja a vírushatás növényben jelentősen eltér. Míg a CIRV a mitokondriális membránból átalakult a citoplazmától szinte teljesen elzárt vesikulumokban replikálódik, addig a TEV az endoplazmatikus membránhoz kapcsolódó replikációs komplexekben. Vizsgálatunk célja a két vírus szupresszor hatásának vizsgálata természetes vírushatás esetében. Megállapítottuk, hogy míg a TEV Hc-Pro jelentősen gátolja a miRNS és vírus siRNS biogenezisében fontos

szerepet játszó 3' végi metilációt a duplaszálú miRNS intermedierek kötésén keresztül, addig a p19 szupresszor fehérjének alig van kimutatható hatása a miRNS éérésre de gátolja a vírus siRNS metilációját. Sejtfractionálós és immunoprecipitációs vizsgálatokkal igazoltuk, hogy a természetes vírus fertőzés esetében a silencing szupresszor fehérjék hatása az endogén miRNS útvonalakra jelentősen függ a szupresszor fehérjék térben és időbeni expressziójától. A vizsgált szupresszorok hatásmechanizmusát a 3. ábrán foglaltuk össze.

### A HC-Pro és P19 silencing szupresszor fehérjék hatása az RNS silencing útvonalakra



**3. Ábra.** Egyszerűsített modell a HC-Pro és P19 silencing szupresszor fehérjék hatásmechanizmusának bemutatására. Az ábra bal oldalán a fejlődésben fontos szerepet játszó miRNS-ek biogenezeise látható (Developmental regulation). A prekurzor miRNS transzkriptumból a DCL1 nevű dicer kihalítja a ds miRNS intermediér molekulát, amelyet a HEN1 metiltranszferáz metilál a 3' végén, ami biztosítja miRNS-ek stabilitását a sejtben. Majd a ds miRNS inetrmediér beépül a RISC komplexbe ahol a feketével jelölt csillag szál eliminálódik és az érett szál (piros) szekvencia komplementaritás alapján kapcsolódik a target mRNS-hez, aminek a kifejeződését gátolja hasítással vagy transzlációs gátlással. Az ábra jobb oldalán az antivirális válasz (Defence) sematikus modellje látható. A ds vagy az erős másodlagos szerkezettel bíró vírus RNS-eket a DCL4 és DCL2 dicerek hasítják ds siRNS-ekké, amelyek hasonlóan a miRNS inermedierekhez metilálódnak a HEN1 által és a RISC komplexbe beépülve irányítják a vírus RNS szekvenciaspecifikus degradációját. Mig a HC-Pro képes mindkét útvonal gátlására a si/miRNS-ek megkötésével, addig a p19 lényegében csak a silencing alapú antivirális válasz képes gátolni és nincs lényeges hatása a miRNS útvonalra.



Eredményeinket az alábbi közleményekben írtuk le:

Lakatos, L. and Burgyán, J. (2008) Analysis of siRNA-Suppressor of Gene Silencing Interactions. **Methods Mol Biol**, **451**, 331-337.

Lozsa, R., T. Csorba, L. Lakatos, and J. Burgyán. 2008. Inhibition of 3' modification of small RNAs in virus-infected plants require spatial and temporal co-expression of small RNAs and viral silencing-suppressor proteins. **Nucleic Acids Res** **36**:4099-107.

Burgyán, J. (2008) Role of Silencing Suppressor Proteins. **Methods Mol Biol**, **451**, 69-79.